

阳离子铝酞菁红区荧光探针测定硫酸软骨素

尹璐, 王敬, 黄萍, 邓雅斌, 李东辉

(厦门大学 医学院 抗癌研究中心, 福建 厦门 361005)

摘要:目的 建立以阳离子铝酞菁为红区荧光探针定量测定硫酸软骨素(CS)的新方法。方法 在 pH 5.0 的 Britton-Robinson(B-R) 缓冲溶液中, 阳离子铝酞菁与 CS 发生相互作用形成离子缔合物而导致荧光猝灭。在 610 nm 波长光的激发下, 随着 CS 的加入, 探针的特征发射峰(676 nm) 处的荧光强度逐步减弱。结果 在最佳条件下, 荧光强度差值(ΔI_f) 与 CS 浓度($C, \mu\text{g/mL}$) 在 0.2 ~ 1.3 $\mu\text{g/mL}$ 内呈良好的线性关系, 工作曲线为 $\Delta I_f = 406.67 C - 36.23$, $r = 0.997$ 。建立了溶剂沉淀法成功地进行了样品的前处理, 实现了实际样品(滴眼液)的准确测定。结论 该法简便、快速、抗金属离子及小分子干扰的能力较强, 可用于复杂实际样品中 CS 的含量测定。

关键词: 硫酸软骨素; 荧光分光光度法; 酞菁; 红区荧光探针; 含量测定

中图分类号: O657.3; R927.3 文献标识码: A 文章编号: 1005-4678(2011)04-0277-04

Fluorimetric determination of chondroitin sulfate with cationic aluminum phthalocyanine used as a fluorescent probe emitting at red-region

YIN Lu, WANG Jin, HUANG Ping, DENG Ya-bin, LI Dong-hui

(Cancer Research Center, School of Medicine, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Purpose To propose a novel method for quantitative determination of chondroitin sulfate (CS) in practical samples using cationic aluminum phthalocyanine as a fluorescence probe emitting at red-region. **Methods** It was found that the fluorescence of [Tetra(trimethylammionio) aluminum phthalocyanine], a cationic red-region fluorescence probe, was extremely quenched by CS in acidic media, because of the formation of association complex between TTMAAlPc and CS. Based on this phenomenon, a new method was developed for quantitative determination of CS. **Results** Under the optimal conditions (pH 5.0, a reaction time of 10 min, and at room temperature), the linear range of assay was 0.2-1.3 $\mu\text{g/mL}$ and the detection limit was 0.021 $\mu\text{g/mL}$. Establishing a solvent precipitation method for sample pre-treatment successfully, we achieve the accurate determination of actual sample (eye drops). **Conclusion** The constructed method is not only accurate but also reliable. It has been used to the analysis of practical samples (eye-drops) with satisfied results, exhibiting the great potential for practical applications.

Key words: chondroitin sulfate; fluorospectrophotometry; phthalocyanine; red-region fluorescence probe; assay

硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS)是从动物软骨中提取的酸性黏多糖。临床上用作骨关节炎和类风湿性关节炎的防治药物,具有抗凝血、抗肿瘤、抗关节炎等生理活性,在医学材料、保健品等领域的

应用越来越引起人们的重视^[1]。对冠心病、动脉粥样硬化等心血管疾病、骨关节炎等也有一定的疗效^[2-3]。CS 常见的测定方法有高效液相色谱法^[4]、比色法^[5]、AHMT 分光光度法^[6]、离子色谱法^[7]、分光光度法^[8]、高效毛细管电泳法^[9]等。但上述方法尚存在一些不足之处,如对仪器和试剂要求较高,操作较为繁琐,精密度、准确度、抗干扰能力较低等。四取代三甲基碘化铵金属酞菁是一类阳离子染料,如中心配位元素为反磁性原子,则化合物具有红区发射的荧光特性,可有效避开背景荧光和散射光的

收稿日期: 2011-04-06

基金项目: 国家自然科学基金(No. 90206016, 20015005)和福建省公益类科研院所基本科研专项(No. 2010R1101)

作者简介: 尹璐,女,硕士研究生,从事生化分析研究;李东辉,通信作者,Email: Lidh@xmu.edu.cn。

干扰,且光漂白作用小。酸性条件下,此类化合物带正电荷,易与带阴离子基团的生物大分子发生静电作用而形成离子缔合物。本文利用该类化合物的上述特点,以四取代三甲基碘化铵铝酞菁[Tetra(trimethylammionio)aluminum phthalocynine, TTMAAlPc]为红区荧光探针,在酸性介质中与CS发生结合反应,导致体系荧光强度降低,建立了CS荧光定量分析新方法。

1 材料

TTMAAlPc按文献[10]方法合成并纯化,配制 1.0×10^{-3} g/mL储备液。

CS(纯度95%),Sigma公司;复方CS滴眼液,山东博士伦福瑞达制药有限公司;其他试剂均为分析纯,实验用水为高纯水。

LS-55 荧光分光光度计,美国PerkinElmer公司;sbs型pH计,美国奥立龙公司;Spectra Max M5-多功能酶标仪,美国Molecular Devices公司。

2 方法与结果

2.1 测定方法

0.2 mol/L Britton-Robinson(B-R)系列缓冲液:在浓度均为0.04 mol/L的磷酸、乙酸、硼酸混合液100 mL中加入一定体积的0.2 mol/L NaOH溶液,即得相应pH值缓冲液。

1.0 mg/mL CS储备液,4℃冰箱保存,工作液即用即配。

在5 mL比色管中依次加入适量水、 1.0×10^{-4} g/mL TTMAAlPc溶液、1/10体积pH 5.0的B-R缓冲液、一定量的CS溶液,用水稀释至刻度,摇匀后于室温下静置反应10 min。以试剂空白为参比,用3 mL样品池在676 nm波长处测量不同浓度CS的荧光强度。试剂空白记为 I_0 ,含有CS的记为 I_f ,荧光强度差 $\Delta I_f = I_0 - I_f$ 。

2.2 阳离子酞菁的分子结构和光谱特性

TTMAAlPc(图1)是一种具有类似卟啉结构的强荧光化合物,由于其外周的四个苯环上各有一强极性的阳离子基团,因而在水中的溶解度较大,便于实际应用。TTMAAlPc的荧光发射峰(676 nm)处于红区(图2),其激发带有两个,一个位于紫外区称Soret带;另一个位于长波处,称Q带。如采用短波激发,将在其倍频处产生很强的二级散射(散射峰在700 nm左右),故为避开此二级散射的干扰,激发波长选择在长波处(610 nm)。加入CS后,TTMAAlPc的荧光发生猝灭,但峰位置并未改变。阳离子金属酞菁易于与带有阴离子的生物大分子形成

离子缔合物而发生减色效应与荧光猝灭现象^[11]。CS的分子骨架上带有酸性基团-COOH和-SO₃H,在弱酸性介质中,TTMAAlPc与荷负电的CS发生相互作用而聚集,导致荧光猝灭,本文的方法即是据此荧光猝灭现象而建立。

图3为TTMAAlPc与CS复合物在激发波长为610 nm,在650~750 nm范围内的荧光发射光谱图。在pH 5.0的B-R缓冲液中,阳离子酞菁在676 nm左右有最大发射波长(图3曲线1)。加入CS后发生荧光猝灭,猝灭程度随CS加入量增大而增大(图3曲线2~9)。

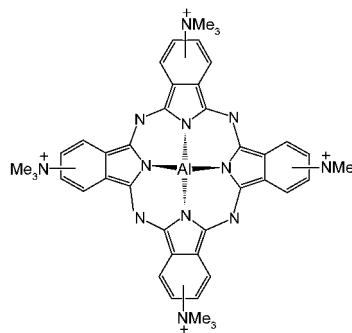


图1 TTMAAlPc的分子结构

Fig. 1 Molecular structure of Tetra(trimethylammionio)aluminum phthalocynine(TTMAAlPc)

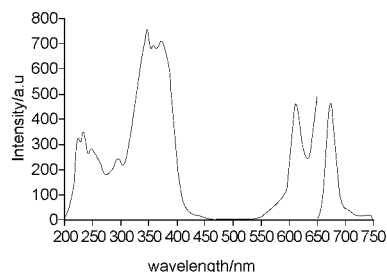
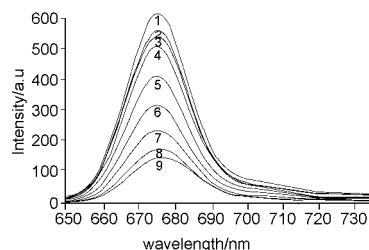


图2 TTMAAlPc的激发和发射波谱图

Fig. 2 Emission and excitation spectra of TTMAAlPc



1. 1.0×10^{-6} mg/mL TTMAAlPc + pH 5.0 B-R 缓冲液; 2~9. CS 浓度分别为 0.2 0.3 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 1.3 μ g/mL

1. 1.0×10^{-6} mg/mL TTMAAlPc + pH 5.0 B-R buffer; 2-9. The concentrations of CS were 0.2 0.3 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 1.3 μ g/mL respectively

图3 荧光发射光谱图

Fig. 3 Fluorescence emission spectra of TTMAAlPc in the presence of different concentrations of CS

2.3 酸度的影响

在 pH 2.2 ~ 12.0 的范围内,考察了体系 pH 对荧光强度变化的影响(图 4)。1.0 × 10⁻⁶ g/mL TT-MAAlPc 加不同 pH 值 B-R 缓冲溶液加浓度为 1.0 μg/mL 的 CS 溶液,溶液总体积 5 mL。可以看出,当 pH 5.0 时 ΔI_f 值达到最大,故本文选用 pH 5.0 的 B-R 缓冲溶液,缓冲液用量为反应总体积的 1/10。

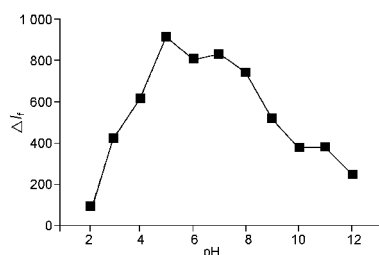


图 4 pH 值对荧光猝灭程度的影响

Fig. 4 Influence of pH on the degree of fluorescence by CS

2.4 反应时间、温度和体系的稳定性

考察了反应时间和温度对结合反应的影响,发现该反应的速度较快,室温下 10 min 即可达到平衡,且体系具有较好的稳定性,荧光强度值在 0.5 h 内维持恒定。

2.5 荧光探针用量的影响

建立了不同 TTMAAlPc 探针浓度(0.5 × 10⁻⁶, 1.0 × 10⁻⁶, 2.0 × 10⁻⁶, 3.0 × 10⁻⁶ g/mL) 下的工作曲线。各浓度线性范围依次为 0.08 ~ 0.8, 0.2 ~ 1.3, 0.6 ~ 2.0, 1.5 ~ 6.0 μg/mL。结果表明,TT-MAAlPc 浓度为 1.0 × 10⁻⁶ g/mL 时,工作曲线线性区间最大,灵敏度亦较好,故选择 TTMAAlPc 的最适浓度为 1.0 × 10⁻⁶ g/mL。

2.6 工作曲线

在优化条件下,以 CS 浓度(*C*, μg/mL) 对 ΔI_f 绘工作曲线,得线性回归方程为 ΔI_f = 406.68 *C* - 36.24, *r* = 0.997, 线性范围 0.2 ~ 1.3 μg/mL, 检测限(3σ) 为 0.021 μg/mL。

2.7 共存物质的影响

分别考察了常见金属离子、氨基酸等物质对体系的干扰(表 1)。可以看出,上述物质的存在对体系测定的影响不大,其相对误差在 ±5.0% 范围内。干扰实验结果表明,本法对上述物质的抗干扰能力要优于文献报道。DNA、蛋白质等生物大分子和表面活性剂的对结果干扰较大,这可能是由于它们参与对 TTMAAlPc 的竞争结合所致。

2.8 实际样品的测定

表 1 常见干扰物对 CS 测定的影响(CS = 1.0 μg/mL)

Tab. 1 Influence of coexisting substances on the determination of CS(CS = 1.0 μg/mL)

物质名称	浓度/(mol/L)	相对误差/%	物质名称	浓度/(μg/L)	相对误差/%
Mn ⁺	1.0 × 10 ⁻⁵	1.20	L-蛋氨酸	1.0	0.20
Ba ²⁺	1.0 × 10 ⁻⁵	1.10	L-组氨酸	1.0	-0.28
Pb ⁺	1.0 × 10 ⁻⁵	2.20	L-苯丙氨酸	1.0	-2.80
Zn ²⁺	1.0 × 10 ⁻⁵	1.40	L-赖氨酸	1.0	1.40
Al ³⁺	1.0 × 10 ⁻⁵	-4.60	L-白氨酸	1.0	4.60
Mg ²⁺	1.0 × 10 ⁻⁵	-1.0	L-苏氨酸	1.0	-1.10
Ca ²⁺	1.0 × 10 ⁻⁵	-0.60	L-脯氨酸	1.0	5.70
Cu ²⁺	1.0 × 10 ⁻⁵	1.70	L-精氨酸	1.0	2.80
β-CD	1.0 × 10 ⁻⁶	-0.83	人血清白蛋白	1.0	3.60
SDS	1.0 × 10 ⁻⁶	2.00	人血丙种球蛋白	1.0	6.20
CTAB	1.0 × 10 ⁻⁶	-6.80	牛血清白蛋白	1.0	5.10
Triton-100	1.0 × 10 ⁻⁶	-1.04	小牛胸腺 DNA	1.0	7.70
CPB	1.0 × 10 ⁻⁶	7.70	鲑鱼精 DNA	1.0	6.20

2.8.1 回收率试验 精密吸取已知浓度的滴眼液溶液 20 μL 9 份,置于 9 个 10 mL 量瓶中,分别加入 0.1 mg/mL CS 对照品溶液 20、40 和 60 μL 各 3 份,加水稀释至刻度,按 2.1 项下方法测定含量,并计算回收率,结果分别为 105.1%、100.0%、110.5%、107.1%、107.1%、108.0%、107.3%、107.8% 和 106.2%,平均回收率为 106.6%,RSD 为 2.69% (*n* = 9)。

2.8.2 样品测定 精密吸取 CS 滴眼液 1 mL,加入丙酮 2 mL,并用 5 mol/L NaOH 溶液 2 μL 调节 pH,

摇匀,至沉淀不再增加,离心,取上清液,按 2.1 项下方法测定。

测得滴眼液 CS 含量为 0.14 μg/mL, RSD 为 1.21% (*n* = 9)。

3 讨论

本文建立了一种 CS 荧光定量分析新方法,具有准确、快速、方便的特点。采用的荧光探针 TT-MAAlPc 是一种阳离子酞菁化合物,水溶性好、量子产率高。其荧光发射位于长波(红区)波段,由于在此区域能发荧光的天然或合成的物质极少,且由于

散射光与波长的四次方成反比,因而,使用 TTMAA1-Pc 作为分子探针十分有利于避开试样背景荧光及散射光的干扰,从而提高测定的灵敏度和准确度。此外,由于可采用长波(610 nm)激发,光漂白作用小,有利于体系荧光的稳定。

实际样品的测定是本文拟解决的重点问题,本文选择滴眼液为受试样品,其主要成分为 CS、维生素 E、维生素 B₆、尿囊素、牛磺酸,另有辅料玻璃酸钠、硼酸、硼砂、冰片、薄荷脑、乙醇、吐温 80、三氯叔丁醇等。尤其是其所含的玻璃酸与 CS 同属黏多糖,结构具有相似性,实验表明其对 CS 的测定存在较为明显的干扰,因此需对样品进行前处理以消除干扰。文献推荐的分离二者的方法有:溶剂分级沉淀、季铵盐表面活性剂沉淀、离子交换色谱、凝胶色谱、超滤、电泳^[11]。本文采用溶剂分级沉淀法,这是因为溶剂沉淀法与季铵盐沉淀较为简便,但季铵盐对本法有一定干扰,而其余方法步骤较多,不利于实际应用。我们采用丙酮沉淀,并用 NaOH 溶液调节 pH,成功地实现了玻璃酸与 CS 的沉淀分离,离心后取上清即可进行测定。操作简便、快速,具有较好的实用性,测定结果令人满意。

参考文献:

[1] 卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准(二部)

[S]. 第六册. 1998: 138-139.

- [2] 刘武. 硫酸软骨素药理作用研究进展[J]. 中国药业, 2008, 17(8): 64-66.
- [3] 陈磊, 凌沛学, 张天民. 硫酸软骨素在骨关节炎防治中的作用[J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(2): 137-139.
- [4] Wayne K W, Kathleen G G, Andrew G B. Determination of chondroitin sulfate in nutritional supplements by liquid chromatography & Related Technologies [J]. J Liq Chrom Rel Technol, 2000, 23(18): 2851-2860.
- [5] 董明, 曾正宏, 陈桂阳. 比色法测定复方硫酸软骨素片中硫酸软骨素含量[J]. 中国生化药物杂志, 2002, 23(4): 191-192.
- [6] Kunihiro K, Misako T, Kiyoshi T, et al. Spectrophotometric determination of sodium chondroitin sulfate in eye drops after derivatization with 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole [J]. Analyst, 1995, 120: 2755-2758.
- [7] 茅力. 离子色谱法测定硫酸软骨素的含量[J]. 中国药科大学学报, 1998, 29(5): 358-361.
- [8] 高贵珍, 焦庆才, 丁一磊. 天青 A 分光光度法测定硫酸软骨素含量的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2003, 23(3): 600-602.
- [9] 沈剑如, 陈振德, 于荣敏. 高效毛细管电泳法测定硫酸软骨素含量[J]. 中国生化药物杂志, 2010, 31(3): 197-199.
- [10] Duan W B, Wang Z X, Cook M J. Synthesis of tetra(trimethylammonio) phthalocyanato zinc tetraiodide, [ZnPc(NMe₃)₄]I₄ and a spectrometric investigation of its interaction with calf thymus DNA [J]. Porphyrin Phthalocyanines, 2009, 13: 1255-1261.
- [11] 凌沛学, 张天民. 透明质酸[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002: 5-8.

(上接第 276 页)

PEAS 对脾淋巴细胞周期分布的影响。结果显示, PEAS 能够显著促进脾淋巴细胞由 G0/G1 期向 DNA 合成期即 S 期转化($P < 0.01$), 证明 PEAS 通过诱导淋巴细胞 DNA 合成, 而起到促淋巴细胞增殖的作用。

ELISA 实验结果表明, PEAS 能够显著增加 Th1 型细胞因子 IFN- γ 的分泌, 并且降低 Th2 型细胞因子 IL-4 的分泌($P < 0.05$ 或 0.01)。说明 PEAS 有潜力应用于治疗由于 Th2 细胞因子分泌过多而导致的免疫疾病, 促使 Th 细胞向 Th2 方向偏移的逆转, 从而达到治疗免疫性疾病的目的。

本文的实验结果证明了 PEAS 对小鼠的免疫功能具有一定的正向调节作用, 为其作用机制的阐明奠定了基础。

参考文献:

- [1] 蒋宏雷, 施祥元, 刘伟健. 毛蚶(*Scapharca subcrenata* Lischke) 人工育苗技术的初步研究[J]. 现代渔业信息, 2006, 21(8): 21-23.
- [2] 李谦, 李泰明, 王香琴, 等. 毛蚶提取物生化性质初步分析[J]. 药物生物技术, 1998, 5(4): 245-247.

- [3] 何赞绵, 陈宇星, 刘纯慧, 等. 毛蚶多糖的分离纯化和免疫活性测定[J]. 中国海洋药物, 2007, 26(2): 23-26.
- [4] 王莉, 何赞绵, 姚全胜. 毛蚶多糖免疫调节作用的实验研究[J]. 华西药理学杂志, 2009, 24(4): 340-342.
- [5] Song L Y, Ren S F, Yu R M, et al. Purification, characterization and *in vitro* anti-tumor activity of proteins from *Arca subcrenata* Lischke [J]. Mar Drugs, 2008(6): 418-430.
- [6] 任胜芳, 宋丽艳, 严春艳, 等. 毛蚶中抗癌活性肽高效液相色谱图谱分析研究[J]. 中药材, 2008, 31(8): 1134-1138.
- [7] 李海瑞, 吴希哲, 徐韶瑜, 等. 海洋真菌多糖(YCP)对小鼠淋巴细胞免疫功能的影响[J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(2): 91-93.
- [8] 金丽琴, 薛胜霞, 吕建新, 等. 牛膝多糖衍生物对小鼠脾淋巴细胞增殖及诱导 IL-2 和 TNF- α 的影响[J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(5): 312-314.
- [9] 王翔岩. 肉苁蓉多糖的免疫调节活性及吸收特性研究[D]. 北京: 北京协和医学院药用植物研究所, 2009.
- [10] 王剑, 蒲蕾, 何开泽, 等. 川牛膝多糖的体外免疫活性研究[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(4): 481-483.
- [11] 季宇彬, 高世勇, 冯小燕, 等. 甜菜碱促进小鼠脾淋巴细胞增殖作用的钙通道机制研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(15): 1959-1963.